



(12) 发明专利申请

(10) 申请公布号 CN 102796700 A

(43) 申请公布日 2012. 11. 28

---

(21) 申请号 201110149665. 5

(22) 申请日 2011. 05. 25

(71) 申请人 李福生

地址 213031 江苏省常州新北区龙虎塘腾龙  
苑 62 幢 602 室

申请人 卢磊磊

(72) 发明人 李福生 卢磊磊 卢淼淼 卢晶晶

(51) Int. Cl.

C12N 5/074 (2010. 01)

C12N 5/095 (2010. 01)

G01N 33/53 (2006. 01)

C12Q 1/02 (2006. 01)

A61L 27/38 (2006. 01)

A61K 35/12 (2006. 01)

A61K 35/24 (2006. 01)

A61K 35/42 (2006. 01)

---

权利要求书 2 页 说明书 9 页

(54) 发明名称

一种筛选、识别干细胞的试剂盒及其应用

(57) 摘要

本发明涉及一种筛选、识别干细胞的试剂盒及其应用, 本发明的试剂盒包括: 筛选试剂、细胞洗涤液、识别试剂、细胞因子组合、使用说明书及相应试剂混合容器。试剂盒所述的筛选试剂为化疗药物, 识别试剂用于对筛选后的干细胞群和或其子代进行识别, 本试剂盒可实现工业化批量生产, 使用简便、特异性强、实用有效, 可直接用于啮齿动物、人类或其他哺乳动物的干细胞筛选、识别, 具有广泛应用前景。

1. 一种筛选、识别干细胞的试剂盒,其特征在于,所述试剂盒包括:
  - 1) 筛选试剂;
  - 2) 细胞洗涤液;
  - 3) 识别试剂;
  - 4) 细胞因子组合;
  - 5) 描述使用方法的说明书,以及任选的;
  - 6) 混合容器和装置。

其中,所述筛选试剂选择包括抗生素化疗药物、抗代谢化疗药物、烷化剂化疗药物、激素及内分泌化疗药物、植物化疗药物、亚硝脲类化疗药物、抗体阻断剂化疗药物、门冬酰胺酶、甲基苄肼、草酸铂、铂类、丙亚胺、羟基脲和氨烯咪胺的一种或两种以上的组合。

其中,所述识别试剂选择 BrdU、氟标记胸腺嘧啶核苷 (<sup>3</sup>H-TdR)、5-乙炔基-2'脱氧尿嘧啶核苷 (EDU) 和其他可标记所述干细胞群或细胞系或其子代的任一分子或物质。

2. 根据权利要求 1 所述的筛选、识别干细胞的试剂盒,其特征在于,所述化疗药物的浓度约 1mg/kg-100mg/kg 细胞重量,且所述化疗药物作用细胞群的时间范围为 0.1h-72h,或选择使用所述的化疗药物的浓度约 10mg/kg-50mg/kg 细胞重量,且所述化疗药物作用细胞群的时间范围为 0.5h-36h。

3. 根据权利要求 1 所述的筛选、识别干细胞的试剂盒,其特征在于,所述识别试剂使用的浓度约 0.1mg/kg-15mg/kg 细胞重量,所述标记作用于所述筛选后干细胞群的时间为 0.01h-96h。

4. 根据权利要求 1 所述的筛选、识别干细胞的试剂盒,其特征在于,所述化疗药物选择以抗代谢化疗药物、烷化剂化疗药物、抗生素化疗药物、植物化疗药物联合铂类化疗药物任一一种的组合。

5. 根据权利要求 1 所述的筛选、识别干细胞的试剂盒,其特征在于,所述细胞洗涤试液可为生理盐水、PBS、或其他缓冲液。

6. 根据权利要求 1 所述的筛选、识别干细胞的试剂盒,其特征在于,所述细胞因子选择 EGF、B27、bEGF、N2、Heparin、LIF 为基础的细胞因子组合,其中所述 EGF 终浓度为 5ng/mL-100ng/mL,优选 10ng/mL-50ng/mL,所述 bFGF 终浓度为 5ng/mL-100ng/mL,优选 10ng/mL-50ng/mL,所述 Heparin 终浓度为 2 μg/mL-40 μg/mL,所述 B27、N2 终浓度分别为 2ng/mL-50ng/mL,优选 10ng/mL-30ng/mL,所述 LIF(白血病抑制因子)终浓度为 100U/mL-1500U/mL,优选 500U/mL-1000U/mL。

7. 根据权利要求 1 所述的试剂盒,其特征在于,所述试剂盒的标记干细胞携带的标记也可选择为磁性氧化铁标记、量子点标记、GFP 标记、RFP 标记或其他任何可以让所述筛选的干细胞和或子代携带的标记。

8. 根据权利要求 1 至 7 所述的筛选、识别干细胞试剂盒的使用方法,其使用包括如下步骤:

- a) 细胞预处理:收集经处理后的细胞,台盼蓝染色计算细胞存活率,随后,低温以 800 ~ 1000g 离心 3min ~ 5min,丢弃上清,称重细胞重量。
- b) 混合筛选试剂:通过筛选试剂混合容器进行筛选试剂的混合。
- c) 筛选干细胞:细胞重新接种于培养瓶或培养板或培养皿内按照细胞重量加入一定

浓度的筛选试剂,随后,于 37℃,5% CO<sub>2</sub> 条件下培养一定时间再收集细胞,筛选试剂加入次数可以为 1 ~ 10 次。

d) 计算细胞存活率:收集细胞,低温以 800 ~ 1000g 离心 3min ~ 5min,丢弃上清,加入细胞洗涤液洗涤 1 ~ 2 次,计算细胞存活率后,离心丢弃上清,称重细胞重量。

e) 混合识别试剂:通过识别试剂混合容器进行识别试剂的混合。

f) 识别干细胞:加入细胞标记试剂对筛选后的干细胞进行识别,于 37℃,5% CO<sub>2</sub> 包含多种细胞因子组合的条件下培养,细胞标记的浓度为约 0.1mg/kg-15mg/kg 细胞重量,其中,所述标记作用时间为 0.01h-96h,标记加入次数可以为 1 ~ 20 次。

g) 标记检测:每隔一定时间采用单克隆抗体或多克隆抗体以特异性检测细胞标记,其中所述抗体为免疫球蛋白分子,能够结合靶目标,其结合方式是至少识别免疫球蛋白的可变区的一个抗原位点,所述抗体不仅包括全抗体分子,也包括它们的片段,例如 Fab、Fab'、Fv、单链 (ScFv) 等,或者它们的突变体,或者是包含抗体部分的融合蛋白,完全化的或部分化的人源化抗体及任何其他的被修饰的免疫球蛋白分子,其中所述免疫球蛋白分子包含一个抗原结合位点,其中,所述抗体选择携带荧光素、生物素、放射性标记、酶标记、荧光底物标记、显色底物标记、化学发光标记等中的任何一种。

9. 根据权利要求 8 所述的试剂盒,其特征在于,所述试剂盒筛选、识别的干细胞群来自啮齿动物、人类及其他哺乳动物的正常离体或活检组织、细胞系、肿瘤 / 癌前组织、癌 / 肿瘤性组织、转移瘤 / 癌组织的一种或两种以上的组合。

10. 根据权利要求 1 所述的筛选、识别干细胞的试剂盒,其特征在于,所述试剂盒有益于基础、临床与应用研究、组织工程、治疗、药物筛选、修复和再生受损或患病组织等领域的应用。

## 一种筛选、识别干细胞的试剂盒及其应用

### 技术领域

[0001] 本发明涉及一种筛选、识别啮齿动物、人类或其他哺乳动物干细胞的试剂盒及其应用。

### 背景技术

[0002] 众所周知,干细胞具有下述特征:1) 长期的自我更新能力;2) 能够产生高度分化的其它种类细胞;3) 本身处于未分化状态;4) 一般处于慢周期或静息状态;5) 组织中处于相应的小生境(niches)内。

[0003] 干细胞包括胚胎干细胞(Embryonic stem cells, ESCs)和成体干细胞(Adult Stem Cells, ASCs),胚胎干细胞是全能性的,在理论上于体内可以再生身体内几乎任意组织,但由于其一方面在获取的伦理、道德等方面遇到了问题,另一方面其在应用上遇到了较为严重的问题,例如移植的胚胎干细胞可控性差,有生长为肿瘤的风险,并且其在移植受体后将会受到受体免疫系统的排斥等等,从而限制了其应用。

[0004] 鉴于胚胎干细胞研究及应用所遇到的上述问题,科学家期望通过核编程的方式让成体细胞能够回到类胚胎干细胞的状态,经过几十年的研究,终于,在2006年日本科学家山中伸弥(Yamanaka S, Cell, 2006. 126 (4) :663-676, 日本专利2008-131577)采用四个诱导因子Oct4、nanog、sox2等导入正常人成纤维细胞内,成功重编程其为类胚胎干细胞,被称为诱导多潜能干细胞(induced pluripotent stem cells, iPSCs),该细胞具有类似人类胚胎干细胞的特性,它虽然与胚胎干细胞相似,具有能分化成生物体内所有组织的潜力,但是Lowry和Plath发现(Lowry等, Cell Stem Cell, 2009. 5 (1) :111-123),当进行分子标签比较的时候,胚胎干细胞中某些基因的表达明显与iPS细胞不同,与胚胎干细胞相比, iPS细胞研究仍有问题亟待解决,例如iPSCs具更高基因畸变频率(Loring等, Cell Stem Cell, 2011. 8 (1) :106-118)、致瘤性风险、编程效率低等等需要克服,因而,尽管研究人员取得了令人印象深刻的进展,要把细胞再编程用于治疗疾病还需要更多一些突破。

[0005] 成体干细胞是另外一类具有修复、再生、替代能力的未分化细胞类型,通常位于特定的小生境内,在受到外界损伤后,其会动员或者产生新的干细胞,通过增殖、分化的方式形成新的功能细胞,从而调节组织和器官细胞数量保持动态平衡。成体干细胞的多能性特点首先在骨髓中得到的成体干细胞得以发现。造血干细胞是目前研究的最为详尽的成体干细胞之一,在过去近40年里一直是干细胞领域研究的主题,它们在体内进行自我更新的细胞分裂,在单细胞水平分化为所有的造血成份,并在机能上使得重度骨髓抑制的动物和人的骨髓得以恢复。

[0006] 成体干细胞研究的基础和其在临床上的应用先决条件和最关键条件之一是对干/祖细胞的有效识别、筛选分离。最近越来越多的证据表明成体干细胞可见于多种成熟组织(Moore KA, Science, 2006. 311 (5769) :1880-1885),并且很可能是由处于静息态(细胞周期外且低代谢状态)和激活(细胞周期内且不能保留DNA标记)态的干细胞共存(Li等, Science, 2010. 327 (5965) :542-545),但从成体中分离干细胞仍是极具挑战性的任务,一方

面在于其数量较少且更难于定位、筛选分离各种组织特异性干细胞,另外一方面在于缺少可靠的特异性分子标记物对其进行识别。

[0007] 当前,主要有以下现有技术公开了如何得到相关的成体干细胞:

[0008] 1) 采用分子标志物筛选候选的干细胞,例如 Thy-1<sup>low</sup> 或 FLK2-Lineage<sup>-</sup>Sca-1<sup>+</sup>c-Kit<sup>+</sup> 分选造血干细胞群 (Christensen JL 等, PNAS, 2001. 98 : 14541-14546 ;Uchida N 等, Experimental hematology, 1996. 24 :649-659), 用 CD14<sup>+</sup> 免疫磁性分离的方法从外周血筛选新的干细胞群 (PCT/055950 干细胞的提纯、识别及用途) 用  $\alpha_6^{\text{bri}} 10G7^{\text{dim}}$  (LiA 等, PNAS, 1998. 95(7) :3902-3907 ;Tani H 等, PNAS, 2000. 97(20) : 10960-10965 ;Lavker RM 等, PNAS, 2000. 97(25) :13473-13475) 识别人类、啮齿动物来源的上皮干细胞,但其有效性还有待进一步证实;

[0009] 2) 以其他技术联合分子标记进行干细胞的筛选、富集:比如公开号为 CN108677A 的一种干细胞靶向定位富集的方法,采用针对干细胞表面标志性抗原的特异性抗体与干细胞结合,再标记上免疫磁珠,移植后通过两个异性磁极将干细胞富集于靶组织内。Azuma 等研究小组者采用机械或酶消化分离后结合已知分子标志物的方法,希望从成体组织中直接分离出干 / 祖细胞,从而对其进行鉴别及后续的功能研究 (Azuma H 等, Hepatology, 2003. 37(6) :1385-1389 ;Wright N 等, Biochem Biophys Res Commun, 2008. 366(2) : 367-372)。通过小鼠遗传学标志谱系试验等实验,结合所发现的分子标志物,例如 Musashi-1、Lgr5 等提供了鉴定干细胞的可能 (Barker N 等, Nature, 2007. 449(7165) : 1003-1007 ;Haegebarth A 等, Am J Pathol, 2009. 174(3) :715-721), 然而它们的有效性还有待进一步证实。不足之处是,磁珠标记可能会影响细胞活力,而酶消化作用时间又较长,富集后细胞活力不高,且这些分离的细胞群并不是同质类型的,而是由许多不同分化状态或增殖能力的混合细胞群组成,非常不纯。

[0010] 3) 侧群筛选法 (side population, SP), 分化程度较低的干 / 祖细胞通常表达一些 ATP 结合转运蛋白 (ATP-binding cassette, ABC), 细胞常利用 ATP 能量把外来的有毒物质从细胞内排出,以达到保护自身的目的, 早期 Goodell 等 (Goodell 等, J Exp Med, 1996. 183(4) :1796-1806) 的研究发现, 当用 Hoechst33342 对骨髓细胞进行染色后, 造血干细胞具有很强的排出染液的能力, 被称为侧群细胞。最近, Wulff 等 (Wulff 等, Haematologica, 2003. 88(4) :368-378) 从小鼠肝内分离到一群 SP 细胞, CD45<sup>+</sup> 或 CD45<sup>-</sup> 细胞亚群, 其所占的百分比为 1%, 体外培养均可产生肝系和造血系起源的克隆, 类似的研究结果在人类的成体肝组织内也分离到类似的 SP 细胞。此方法已被用于从其他器官和组织中筛选潜在的干 / 祖细胞群, 不足之处是, 当从实体组织中筛选出 SP 细胞后, 由于获得活细胞的能力有限, 当此类细胞进行移植后可能影响他们的重塑能力。

[0011] 4) 采用损伤联合移植实验进行干细胞特性的研究, 例如:Li 等 (Li WL 等, Stem cells, 2006. 24(2) :322-332) 从倒千里光碱 / 部分肝切除 (Retrorsine/Partial Hepatectomy, Rs/PH) 处理后成年小鼠的肝内分离到一种细胞群, 在培养期间, 其可以分化为肝细胞和胆管上皮细胞, Li 等认为这群细胞具有干 / 祖细胞潜能, 被称为肝上皮祖细胞 (liver epithelial progenitor cells, LEPCs)。移植实验提示其具有分化的潜能。然而类似的损伤试验加入的药物通常具有致癌特性, 是否其导致组织中的细胞发生癌变, 转变为具有干细胞特性的前体细胞尚不清楚。

[0012] 5) 根据核形态进行干细胞的鉴别,例如, PCT/021504 专利公开了一种根据细胞核形态鉴定干细胞的方法,通过观察经处理后的组织样品中分布的细胞核形态,核形态型的类型选自:钟形、雪茄形、凝聚球形、球形、卵形、香肠形、肾形和子弹形,从而允许显微组织学/病理学技术人员根据核形态,将细胞区分为干细胞/非干细胞。

[0013] 6) 幼年动物脉冲追踪法进行干细胞的识别,早期的研究发现,当加入可以“标记”DNA 的标记后,与分裂迅速的祖细胞相比,干细胞由于其具有慢周期或静息期的特性而具有长期保留 DNA 标记的能力 (Bickenbach JR, J Dent Res, 1981. 60 (Spec No C) : 1611-1620),这一方法已经被用于识别小肠、子宫内膜、胰腺、肾乳头等组织中的干细胞。

[0014] 7) 基于干细胞的功能特征,例如耐受药物或其他试剂的处理,报道了用于激活干细胞的方法, (Gordon MY 等, Leukemia research, 1985. 9 :1017-1021 ;Berardi AC 等, Science, 1995. 267 :104-108 ;Sharkis SJ 等, Stem cells, 1997. 15 (Suppl 1) :41-44 ;Juopperi TA 等, Experimental hematology, 2007. 35 :335-341),且用一些分子表面标记物分离这些细胞,然而,不足之处,一方面在于是他们所使用的分子标记仍没有很强的特异性,且其中仍不清楚是否混杂有其它分期的祖细胞以及原先存在的增殖细胞,很可能其中仍是一个异质细胞群 (Berardi AC 等, Science, 1995. 267 :104-108),更重要的是,没有进一步采用可靠且普遍有效的方法用于识别这些激活的干细胞。

[0015] 其他如公开号 CN101768570 的专利公开了一种富集和提取成体干细胞的方法,它采用一种多孔的三维组织工程材料埋植到人或动物体内,使得成体干细胞在材料中富集,从而分离得到干细胞。

[0016] 上述所公开描述的方法或技术既有优势也有劣势,例如流式细胞分选法和免疫磁珠法分选往往是根据细胞表面特殊的标记来筛选分离干细胞,但目前特异的细胞表面标记很难达到共识,缺少特异性的分子表面标志,另外,需要借助专业人士的操作仪器来完成,分离时间较长,耗费较高,并且通过一定处理使之带上仪器能识别的标记,这种化学过程对细胞状态会造成一定的影响,操作不当甚至引起分化或导致细胞走向凋亡,另一方面,仪器分选效率不高,长时间的分选过程,导致细胞活力下降,细胞状态改变等问题,这些并不适用于大批量筛选富集干细胞用于科研、临床等使用的需求。

[0017] 再者,缺乏功能性证据表明 LRCs 具有干细胞的功能特征,并且 BrdU 并不是一个细胞表面标志 (Blanpain 等, Cell, 2004. 118 (5) :635-648) ;通过细胞核形态鉴别分离干细胞专业和经验要求高,易于出现鉴别错误,且操作过程和时间比较长。

[0018] 因而,成体干细胞的研究也逐渐为临床医学提供了一个发展新疗法的机会,在组织工程和基因工程技术发展起来的细胞治疗和基因治疗是近年来生物医学领域中的研究热点和前沿,例如使用产生的自体经修饰后的干细胞直接施用给患者从而用于基因治疗 (Nathalie Cartier 等, Science, 2009. 326 (5954) :818-823) 和细胞治疗,成体干细胞作为基因或细胞治疗的载体和首选靶细胞,其中一个益处是减少移植时引起的免疫排斥。

[0019] 成体干细胞在作为临床细胞治疗、药物筛选、人工组织的“种子库”,在肿瘤、创伤修复、组织或器官功能重建、各种退行性疾病的治疗等方面将发挥重要的作用。

## 发明内容

[0020] 本领域需要克服现有技术中所存在的缺点,为了克服上述方法上的不足及提供进

一步相关的优点,本发明公开一种筛选、识别干细胞的试剂盒及其制备方法与应用。本发明提供的试剂盒具有简便快捷、特异性强和普遍适用性,可用于筛选、识别啮齿动物、人类或其他哺乳动物的正常离体或活检组织、细胞系、肿瘤/癌前组织、癌/肿瘤性组织、转移瘤/癌组织来源的干细胞,有益于基础、临床与应用研究、组织工程、治疗、药物筛选、修复和再生受损或患病组织等领域的应用。

[0021] 本发明的试剂盒包括:

- [0022] 1) 筛选试剂;
- [0023] 2) 细胞洗涤液;
- [0024] 3) 识别试剂;
- [0025] 4) 细胞因子组合;
- [0026] 5) 描述使用方法的说明书,以及任选的;
- [0027] 6) 混合容器和装置。

[0028] 其中,所述筛选试剂选择包括抗生素化疗药物、抗代谢化疗药物、烷化剂化疗药物、激素及内分泌化疗药物、植物化疗药物、亚硝脲类化疗药物、抗体阻断剂化疗药物、门冬酰胺酶、甲基苄肼、草酸铂、铂类、丙亚胺、羟基脲和氨烯咪胺的一种或两种以上的组合。

[0029] 其中,所述识别试剂选择 BrdU、氚标记胸腺嘧啶核苷(<sup>3</sup>H-TdR)、5-乙炔基-2'脱氧尿嘧啶核苷(EDU)和其他可标记所述干细胞群或细胞系或其子代的任一分子或物质。

[0030] 其中,所述化疗药物的浓度约 1mg/kg-100mg/kg 细胞重量,且所述化疗药物作用细胞群的时间范围为 0.1h-72h,或选择使用所述的化疗药物的浓度约 10mg/kg-50mg/kg 细胞重量,且所述化疗药物作用细胞群的时间范围为 0.5h-36h。

[0031] 其中,所述识别试剂使用的浓度约 0.1mg/kg-15mg/kg 细胞重量,所述标记作用于所述筛选后干细胞群的时间为 0.01h-96h。

[0032] 进一步,所述化疗药物选择以抗代谢化疗药物、烷化剂化疗药物、抗生素化疗药物、植物化疗药物联合铂类化疗药物任一一种的组合。

[0033] 其中,所述细胞洗涤试液可为生理盐水、PBS、或其他缓冲液。

[0034] 其中,所述细胞因子选择 EGF、B27、bEGF、N2、Heparin、LIF 为基础的细胞因子组合,其中所述 EGF 终浓度为 5ng/mL-100ng/mL,优选 10ng/mL-50ng/mL,所述 bFGF 终浓度为 5ng/mL-100ng/mL,优选 10ng/mL-50ng/mL,所述 Heparin 终浓度为 2 μg/mL-40 μg/mL,所述 B27、N2 终浓度分别为 2ng/mL-50ng/mL,优选 10ng/mL-30ng/mL,所述 LIF(白血病抑制因子)终浓度为 100U/mL-1500U/mL,优选 500U/mL-1000U/mL。

[0035] 其中,所述试剂盒的标记干细胞携带的标记也可选择为磁性氧化铁标记、量子点标记、GFP 标记、RFP 标记或其他任何可以让所述筛选的干细胞和或子代携带的标记。

[0036] 本发明的试剂盒涉及本发明人预料之外的发现,该试剂盒可特异性的从混合细胞群中筛选、富集到干细胞群,并采用细胞标记对筛选的干细胞群和或其子代进行识别。

[0037] 本发明还进一步公开了筛选、识别干细胞试剂盒的使用方法,其使用包括如下步骤:

[0038] a) 细胞预处理:收集处理后的细胞,台盼蓝染色计算细胞存活率,随后,低温以 800 ~ 1000g 离心 3min ~ 5min,丢弃上清,称重细胞重量。

[0039] b) 混合筛选试剂:通过筛选试剂混合容器进行筛选试剂的混合。

[0040] c) 筛选干细胞:细胞重新接种于培养瓶或培养板内按照细胞重量加入一定浓度的筛选试剂,随后,于 37℃,5% CO<sub>2</sub> 含多种细胞因子的条件下培养一定时间再收集细胞,其中,筛选试剂加入次数可以为 1 ~ 10 次。

[0041] d) 计算细胞存活率:收集细胞,低温以 800 ~ 1000g 离心 3min ~ 5min,丢弃上清,加入细胞洗涤液洗涤 1 ~ 2 次,计算细胞存活率后,离心丢弃上清,称重细胞重量。

[0042] e) 混合识别试剂:通过识别试剂混合容器进行识别试剂的混合。

[0043] f) 识别干细胞:加入细胞标记试剂对筛选后的干细胞进行识别,于 37℃,5% CO<sub>2</sub> 包含多种细胞因子组合的条件下培养,细胞标记的浓度为约 0.1mg/kg~15mg/kg 细胞重量,其中,所述标记作用时间为 0.01h~96h,标记加入次数可以为 1 ~ 20 次。

[0044] g) 标记检测:每隔一定时间采用单克隆抗体或多克隆抗体以特异性检测细胞标记,其中所述抗体为免疫球蛋白分子,能够结合靶目标,其结合方式是至少识别免疫球蛋白的可变区的一个抗原位点,所述抗体不仅包括全抗体分子,也包括它们的片段,例如 Fab、Fab'、Fv、单链 (ScFv) 等,或者它们的突变体,或者是包含抗体部分的融合蛋白,完全化的人源化抗体及任何其他的被修饰的免疫球蛋白分子,其中所述免疫球蛋白分子包含一个抗原结合位点,其中,所述抗体选择携带荧光素、生物素、放射性标记、酶标记、荧光底物标记、显色底物标记、化学发光标记等中的任何一种。

[0045] 其中,所述试剂盒筛选、识别的干细胞群来自啮齿动物、人类及其他哺乳动物的正常离体或活检组织、细胞系、肿瘤 / 癌前组织、癌 / 肿瘤性组织、转移瘤 / 癌组织的一种或两种以上的组合。

[0046] 进一步,所述筛选分离的干细胞群和或其子代源自肝脏组织、肾脏组织、心脏组织、胰腺组织、肠组织、表皮组织、卵巢组织、输卵管组织、睾丸组织、神经组织、胃组织、肺组织、乳腺组织、脂肪组织、肌肉组织、甲状腺、间充质、脾脏组织、骨髓组织、外周血、脐带血、经血、胎盘、牙组织、眼组织和脑组织中的一种或两种以上所组成的组中。

[0047] 其中,所述组织来源于啮齿动物、人类或其他哺乳动物的活检或离体正常组织。

[0048] 进一步,所述筛选分离的干细胞群和或其子代源自介于正常组织与癌 / 肿瘤性组织之间的啮齿动物、人类及其他哺乳动物来源的肿瘤 / 癌前任意病变组织。

[0049] 进一步,所述筛选分离的干细胞群和或其子代源自肝癌、肾癌、胰腺癌、肠癌、卵巢癌、乳腺癌、脑癌、肺癌、肝部转移瘤、肺转移瘤、肿瘤细胞系和或肿瘤 / 癌活检、离体组织等材料的一种或两种以上所组成的组中。

[0050] 其中,肿瘤细胞系包括源自啮齿动物、人类或其他哺乳动物的肿瘤组织建立的肿瘤细胞系。

[0051] 其中,所述试剂盒有益于基础、临床与应用研究、组织工程、治疗、药物筛选、修复和再生受损组织等领域的应用。

## 具体实施方式

[0052] 以下对本发明的具体实施例进行说明,但本领域的技术人员应当理解,本发明的实施例目的是为了清楚的说明本发明的优点,不是用于限制本发明,任何基于本发明的修改、替换均落在本发明的精神范畴和保护范围之内。

[0053] 实施例 1 肝癌干细胞筛选、识别试剂盒及其使用

[0054] 一、肝癌干细胞筛选、识别试剂盒

[0055] 1) 筛选试剂；

[0056] 2) 生理盐水；

[0057] 3) 识别试剂；

[0058] 4) 细胞因子组合；

[0059] 5) 肝癌干细胞筛选、识别的使用说明书；

[0060] 6) 筛选、识别试剂的混合容器。

[0061] 其中，筛选试剂选择氟尿嘧啶、环磷酰胺、卡铂。

[0062] 其中，识别试剂选择 BrdU 试剂。

[0063] 其中，试剂盒在生产过程中保持无菌操作以确保其内含物是无菌的，且内毒素含量检测≤0.5EU/mL 表示试剂盒合格。

[0064] 二、材料与方法

[0065] 1. 材料：

[0066] 1.1 肝癌组织取材：啮齿动物、人或其他哺乳动物的活检或离体新鲜肝癌组织样品。

[0067] 1.2 组织处理方法：PBS 缓冲液清洗组织 2～3 次，再用眼科剪将组织剪碎成约 1mm<sup>3</sup> 的小块，加入胰酶（浓度为 0.1%～0.3%）后在 37℃ 消化 10min～60min，加入与胰酶溶液体积等量的含 10% 胎牛血清的 DMEM/F12K（美国 Hyclone 公司）终止反应，低温以 800～1000g 离心 3min～5min，丢弃上清，加入低温预冷的含 2% 胎牛血清的 PBS 洗涤沉淀 2～3 次，用无菌 100 目～400 目筛网过滤，从而滤出细胞悬液。

[0068] 2. 试剂盒的使用方法：

[0069] a、细胞预处理：获得肝癌组织的单细胞悬液后，台盼蓝染色计算细胞存活率，随后，低温以 800g 离心 3min～5min，丢弃上清，称重细胞重量。

[0070] b、混合筛选试剂：把筛选试剂瓶中所包含的试剂化疗药物氟尿嘧啶、环磷酰胺、卡铂用试剂混合容器进行混合，终浓度分别为 10mg/mL、4mg/mL、4mg/mL。

[0071] c、筛选干细胞：细胞重新接种于培养瓶或培养板或培养皿内按照细胞重量加入经混合后的筛选试剂，随后，于 37℃, 5% CO<sub>2</sub> 条件下培养 16h 再收集细胞，筛选试剂加入次数为 1 次。

[0072] d、计算细胞存活率：收集细胞，低温以 800g 离心 3min～5min，丢弃上清，加入细胞洗涤液洗涤 1～2 次，计算细胞存活率后，离心丢弃上清，称重细胞重量。

[0073] e、混合细胞标记：把识别试剂瓶中所包含的细胞标记试剂 BrdU，用试剂混合容器进行混合，终浓度为 2mg/kg 细胞重量。

[0074] f、识别干细胞：加入混合后细胞标记试剂识别肝癌干细胞，于 37℃, 5% CO<sub>2</sub> 包含 10ng/mL 的 B27、5ng/mL 的 N2、5ng/mL 的 EGF、5ng/mL 的 bFGF、10 μg/mL 的 Heparin, 900U/ml 的 LIF 的条件下培养，其中，所述标记作用时间为 36h，每隔 12h 加入一次，标记加入次数共为 3 次。

[0075] g、标记检测：每隔 12h 进行细胞标记的检测，检测采用 FITC 荧光素标记的抗 BrdU 抗体。

[0076] 其中，整个操作过程保持在无菌条件下进行。

[0077] 根据本发明的试剂盒筛选的肝癌干细胞,可作为临床、基础与应用研究、药物筛选等领域的应用工具。

[0078] 实施例 2 心脏干细胞筛选、识别试剂盒及其使用

[0079] 一、心脏干细胞筛选、识别试剂盒

[0080] 1) 筛选试剂 ;

[0081] 2) PBS 缓冲液 ;

[0082] 3) BrdU 试剂 ;

[0083] 4) 细胞因子组合 ;

[0084] 5) 心脏干细胞筛选、识别的使用说明书 ;

[0085] 6) 筛选、识别试剂的混合容器。

[0086] 其中,筛选试剂选择氟尿嘧啶、丝裂霉素。

[0087] 其中,识别试剂选择 BrdU 和 5- 乙炔基 -2' 脱氧尿嘧啶核苷 (EDU) 试剂。

[0088] 其中,试剂盒在生产过程中保持无菌操作以确保其内含物是无菌的,且内毒素含量检测  $\leq 0.5\text{EU/mL}$  表示试剂盒合格。

[0089] 二、材料与方法

[0090] 1. 材料 :

[0091] 1. 1 心脏组织取材 :啮齿动物、人或其他哺乳动物的正常活检或离体新鲜心脏组织样品。

[0092] 1. 2 组织处理方法 :PBS 缓冲液清洗组织 2 ~ 3 次,再用眼科剪将组织剪碎成约  $1\text{mm}^3$  的小块,加入胶原酶 (浓度为 2 ~ 10mg/mL) 后在 37°C 消化 10min ~ 30min,加入与胶原酶溶液体积等量的含 10% 胎牛血清的 DMEM/F12K (美国 Hyclone 公司) 终止反应,低温以 800 ~ 1000g 离心 3min ~ 5min,丢弃上清,加入低温预冷的含 2% 胎牛血清的 PBS 洗涤沉淀 2 ~ 3 次,用无菌 200 目 ~ 400 目筛网过滤。

[0093] 2. 试剂盒的使用方法 :

[0094] a、细胞预处理 :获得心脏组织的单细胞悬液后,台盼蓝染色计算细胞存活率,随后,低温以 900g 离心 3min ~ 5min,丢弃上清,称重细胞重量。

[0095] b、混合筛选试剂 :把筛选试剂瓶中所包含的试剂化疗药物氟尿嘧啶、丝裂霉素用试剂混合容器进行混合,终浓度分别为 2mg/mL、4mg/mL。

[0096] c、筛选干细胞 :细胞重新接种于培养瓶或培养板内按照细胞重量加入经混合后的筛选试剂,随后,于 37°C,5% CO<sub>2</sub> 条件下培养 24h 再收集细胞,其中,筛选试剂加入次数为 2 次,每隔 12 小时加入 1 次。

[0097] d、计算细胞存活率 :收集细胞,低温以 900g 离心 3min ~ 5min,丢弃上清,加入细胞洗涤液洗涤 1 ~ 2 次,计算细胞存活率后,离心丢弃上清,称重细胞重量。

[0098] e、混合细胞标记 :把识别试剂瓶中所包含的细胞标记试剂 BrdU 和 5- 乙炔基 -2' 脱氧尿嘧啶核苷 (EDU),用试剂混合容器进行混合,终浓度 0.8mg/kg、0.1mg/kg 细胞重量。

[0099] f、识别干细胞 :加入混合后细胞标记试剂识别心脏干细胞,于 37°C,5% CO<sub>2</sub> 包含 10ng/mL 的 B27、10ng/mL 的 N2、30ng/mL 的 EGF、30ng/mL 的 bFGF、10 μg/mL 的 Heparin,6000U/ml 的 LIF 的条件下培养,其中,所述标记作用时间为 24h,每隔 6h 加入一次,标记加入次数共为 4 次。

[0100] g、标记检测 :每隔 12h 进行细胞标记的检测,检测采用 FITC 荧光素标记的抗 BrdU 抗体。

[0101] 其中,整个操作过程保持在无菌条件下进行。

[0102] 根据本发明的试剂盒筛选的心脏干细胞,可作为临床、基础与应用研究、组织工程、治疗、药物筛选、修复受损或患病组织等领域的应用工具。

[0103] 实施例 3 肺干细胞筛选、识别试剂盒及其使用

[0104] 一、肺干细胞筛选、识别试剂盒

[0105] 1) 筛选试剂 ;

[0106] 2) PBS 缓冲液 ;

[0107] 3) BrdU 试剂 ;

[0108] 4) 细胞因子组合 ;

[0109] 5) 使用说明书 ;

[0110] 6) 筛选、识别试剂的混合容器。

[0111] 其中,筛选试剂选择氟尿嘧啶、丝裂霉素。

[0112] 其中,识别试剂选择 BrdU 试剂。

[0113] 其中,试剂盒在生产过程中保持无菌操作以确保其内含物是无菌的,且内毒素含量检测  $\leq 0.5\text{EU/mL}$  表示试剂盒合格。

[0114] 二、材料与方法

[0115] 1. 材料 :

[0116] 1. 1 肺脏组织取材 :啮齿动物、人或其他哺乳动物的正常活检或离体新鲜肝脏组织样品。

[0117] 1. 2 组织处理方法 :PBS 缓冲液清洗组织 2 ~ 3 次,再用眼科剪将组织剪碎成约  $1\text{mm}^3$  的小块,加入胶原酶 (浓度为  $4 \sim 10\text{mg/mL}$ ) 后在  $37^\circ\text{C}$  消化  $10\text{min} \sim 45\text{min}$ ,加入与胶原酶溶液体积等量的含 10% 胎牛血清的 DMEM/F12K (美国 Hyclone 公司) 终止反应,低温以  $800 \sim 1000\text{g}$  离心  $3\text{min} \sim 5\text{min}$ ,丢弃上清,加入低温预冷的含 2% 胎牛血清的 PBS 洗涤沉淀 2 ~ 3 次,用无菌 200 目 ~ 400 目筛网过滤。

[0118] 2. 试剂盒的使用方法 :

[0119] a、细胞预处理 :获得肝脏组织的单细胞悬液后,台盼蓝染色计算细胞存活率,随后,低温以  $850\text{g}$  离心  $3\text{min} \sim 5\text{min}$ ,丢弃上清,称重细胞重量。

[0120] b、混合筛选试剂 :把筛选试剂瓶中所包含的试剂化疗药物紫杉醇、足叶乙甙用试剂混合容器进行混合,终浓度分别为  $3\text{mg/mL}$ 、 $10\text{mg/mL}$ 。

[0121] c、筛选干细胞 :细胞重新接种于培养瓶或培养板内按照细胞重量加入经混合后的筛选试剂,随后,于  $37^\circ\text{C}$ , $5\% \text{CO}_2$  条件下培养 48h 再收集细胞,其中,筛选试剂加入次数为 2 次,每隔 24 小时加入 1 次。

[0122] d、计算细胞存活率 :收集细胞,低温以  $850\text{g}$  离心  $3\text{min} \sim 5\text{min}$ ,丢弃上清,加入细胞洗涤液洗涤 1 ~ 2 次,计算细胞存活率后,离心丢弃上清,称重细胞重量。

[0123] e、混合细胞标记 :把识别试剂瓶中所包含的细胞标记试剂 BrdU,用试剂混合容器进行混合,终浓度  $4\text{mg/kg}$  细胞重量。

[0124] f、识别干细胞 :加入混合后细胞标记试剂识别肺干细胞,于  $37^\circ\text{C}$ , $5\% \text{CO}_2$  包含

8ng/mL 的 B27、8ng/mL 的 N2、10ng/mL 的 EGF、10ng/mL 的 bFGF、10  $\mu$  g/mL 的 Heparin, 900U/ml 的 LIF 的条件下培养, 其中, 所述标记作用时间为 24h, 每隔 6h 加入一次, 标记加入次数共为 4 次。

[0125] g、标记检测: 每隔 12h 进行细胞标记的检测, 检测采用 TRITC 荧光素标记的抗 BrdU 抗体。

[0126] 其中, 整个操作过程保持在无菌条件下进行。

[0127] 根据本发明的试剂盒筛选的肺干细胞, 可作为临床、基础与应用研究、组织工程、治疗、药物筛选、修复受损或患病组织等领域的应用工具。

[0128] 显然在不违反本发明的领域及范畴下, 可以对上述筛选、识别干细胞的试剂盒进行成分的修饰及或增加, 本发明是以上述实施例进行试剂盒及其应用的说明, 并不是用于限制试剂盒的使用, 对此进行的任何等同替换、修改、增加均属于本发明的保护范畴内。

专利名称(译)	一种筛选、识别干细胞的试剂盒及其应用		
公开(公告)号	<a href="#">CN102796700A</a>	公开(公告)日	2012-11-28
申请号	CN201110149665.5	申请日	2011-05-25
[标]申请(专利权)人(译)	李福生		
申请(专利权)人(译)	李福生 卢磊磊		
当前申请(专利权)人(译)	李福生 卢磊磊		
[标]发明人	李福生 卢磊磊 卢淼淼 卢晶晶		
发明人	李福生 卢磊磊 卢淼淼 卢晶晶		
IPC分类号	C12N5/074 C12N5/095 G01N33/53 C12Q1/02 A61L27/38 A61K35/12 A61K35/24 A61K35/42		
外部链接	<a href="#">Espacenet</a> <a href="#">Sipo</a>		

**摘要(译)**

本发明涉及一种筛选、识别干细胞的试剂盒及其应用，本发明的试剂盒包括：筛选试剂、细胞洗涤液、识别试剂、细胞因子组合、使用说明书及相应试剂混合容器。试剂盒所述的筛选试剂为化疗药物，识别试剂用于对筛选后的干细胞群和或其子代进行识别，本试剂盒可实现工业化批量生产，使用简便、特异性强、实用有效，可直接用于啮齿动物、人类或其他哺乳动物的干细胞筛选、识别，具有广泛应用前景。